

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

第 1 部門第 1 区分

特表平9-509313

(43) 公表日 平成 9 年 (1997) 9 月 22 日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
1/12		9282-4B	1/12	
// C 1 2 P 21/02		9637-4B	C 1 2 P 21/02	C
(C 1 2 N 1/12				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-520613  
(86) (22) 出願日 平成 7 年 (1995) 1 月 9 日  
(85) 翻訳文提出日 平成 8 年 (1996) 7 月 31 日  
(86) 国際出願番号 PCT/US 95/00132  
(87) 国際公開番号 WO 95/21250  
(87) 国際公開日 平成 7 年 (1995) 8 月 10 日  
(31) 優先権主張番号 08/192, 151  
(32) 優先日 1994 年 2 月 1 日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 バイカル インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国, 92121 カリフォルニア,  
サン ディエゴ, スイート 100, タウン  
センター ドライブ 9373 番地  
(72) 発明者 マークェット, マグダ  
アメリカ合衆国, 92037 カリフォルニア,  
ラ ジョラ, アベニダ デ ラス オン  
ダス 8540 番地  
(72) 発明者 ホーン, ナンシー  
アメリカ合衆国, 92126 カリフォルニア,  
サン ディエゴ, ハーダー ドライブ  
11545 番地  
(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外 3 名)  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬品等級プラスミド DNA の製造方法

(57) 【要約】

本発明は、(a) プラスミド DNA を有する細胞を溶解して溶解物を取得し、(b) 該溶解物を不溶性物質除去手段で処理して溶解液を取得し、そして (c) 該溶解液に分画 PEG 沈殿及びクロマトグラフィーを適用して前記プラスミド DNA を精製する、工程を含むプラスミド DNA の製造方法に関するものである。本発明の他の態様では、プラスミド DNA は GRAS 試薬を用いて製造され、プラスミド DNA は酵素の不存在下で製造され、プラスミド DNA は有機抽出剤の不存在下で製造され、プラスミド DNA は突然変異原の不存在下で製造され、プラスミド DNA が大規模で製造されるように前記溶解、処理及び適用工程の規模が拡大可能であり、また、これらの溶解、処理及び適用工程は医薬品等級物質を生成する。

## 【特許請求の範囲】

1. (a) プラスミドDNAを含有する細胞を溶解して溶解物を取得し、  
(b) 不溶性物質除去手段で前記溶解物処理して溶解液を取得し、そして  
(c) 前記溶解液に分離PEG沈殿及びクロマトグラフィーを適用して前記プラスミドDNAを精製する、  
工程を含むプラスミドDNAの製造方法。
2. 前記プラスミドDNAがGRAS試薬を用いて製造される請求項1に記載の方法。
3. 前記プラスミドDNAが酵素の不存在下で製造される請求項1に記載の方法。
4. 前記プラスミドDNAが有機抽出剤の不存在下で製造される請求項1に記載の方法。
5. 前記プラスミドDNAが突然変異原の不存在下で製造される請求項1に記載の方法。
6. 前記プラスミドDNAが大規模で製造されるように前記溶解、処理及び適用工程の規模が拡大可能である請求項1に記載の方法。
7. 前記溶解、処理及び適用工程が医薬品等級物質を生成する請求項1に記載の方法。
8. (d) 前記プラスミドDNAを製剤化し、滅菌しそしてバイアル充填して治療投与に適する製品を得る工程を更に含む請求項1に記載の方法。
9. 前記滅菌がろ過を含む請求項8に記載の方法。
10. 前記細胞が緩衝液に懸濁されそして希塩基又は希塩基と界面活性剤中で溶解される請求項1に記載の方法。
11. 前記緩衝液が酢酸ナトリウムであり、前記塩基が水酸化ナトリウムでありそして前記界面活性剤が非イオン界面活性剤である請求項10に記載の方法。
12. 前記細胞を酢酸ナトリウム緩衝液に懸濁して均質な細胞懸濁液を取得し、そして前記細胞を水酸化ナトリウムと非イオン界面活性剤の溶液中で溶解して溶解物を取得する請求項11に記載の方法。

24. 前記細胞が大腸菌細胞である請求項1に記載の方法。

13. 前記溶解物がその後の処理の前に酸で中和される請求項12に記載の方法。
14. 前記不溶性物質除去手段がフィルターを含む請求項1に記載の方法。
15. 前記分離PEG沈殿の後に前記クロマトグラフィーを行う請求項1に記載の方法。
16. 前記分離PEG沈殿が、不純物の沈殿物を得るためのPEGによる第1の沈殿及びプラスミドDNA沈殿物を得るためのPEGによる第2の沈殿を含む請求項1に記載の方法。
17. 前記第1の沈殿が前記第2の沈殿に先行する請求項16に記載の方法。
18. 前記第1の沈殿が第1のプラスミドDNA含有溶液にPEGを加えて低いPEG濃度を得ることを含み、そして前記第2の沈殿が第2のプラスミドDNA含有溶液にPEGを加えて高いPEG濃度を得ることを含む請求項16に記載の方法。
19. 前記クロマトグラフィーが、イオン交換クロマトグラフィー若しくはゲル過クロマトグラフィー又はこれらの組合せを含む請求項1に記載の方法。
20. 前記ゲル過クロマトグラフィーが、プラスミドDNA含有溶液を、約20,000塩基対のDNA排除限界を有するサイズ排除媒体に、約8.0のpH及び約150mMの塩濃度で接触させ、そしてプラスミドDNAに富むフラクションを回収することを含む請求項19に記載の方法。
21. 前記イオン交換クロマトグラフィーが、プラスミドDNA含有溶液を除イオン交換体に約8.0のpHで接触させ、約0.7Mから約0.9Mの間の塩勾配で展開し、そしてプラスミドDNAに富むフラクションを回収することを含む請求項19に記載の方法。
22. 工程(b)が、アルコール又はPEGで処理して、該溶解液又は該溶解液から得られるプラスミドDNA含有溶液からプラスミドDNA沈殿物を回収することを更に含む請求項1に記載の方法。
23. 工程(b)が、高濃度塩で処理して、前記溶解液又は前記溶解液から得られるプラスミドDNA含有溶液から不純物の沈殿物を除去することを更に含む請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 医薬品等級プラスミドDNAの製造方法

## 発明の分野

本発明はプラスミドDNAの製造方法に関するものである。本方法は特に、ミリグラム、グラム及びキログラム量の医薬品等級プラスミドDNAを組換え細胞から単離しそして精製する方法に関するものである。本発明の方法は遺伝子治療法の分野で有用である。

## 発明の背景

## A. 背景

医薬品等級のDNAを製造するための新規製造方法を提供する。プラスミドDNAを精製する現在の技術水準の技術は、実験室規模の遠心の使用、有毒な有機溶媒による抽出及び動物由来の酵素（リゾチーム、RNアーゼ、プロテイナーゼK）の使用に依存している。溶解物からのプラスミドDNAの最終精製は、実験室規模の遠心、調製用ゲル電気泳動及び研究装置のクロマトグラフィーなどの方法を使用して達成される。これらの技術はいずれも医薬品等級プラスミドDNAの大規模製造には適していない。現行技術の欠点は以下に説明する。

現行の実験室方法はプラスミドDNA製造にはなじみにくい。プラスミドDNAに富む粗溶解物を調製するために広範に使用されている2つの実験室方法、即ちボーリング法及びアルカリ溶解法が存在する。これらの方法は共に、ニワトリの卵白リゾチームを使用して細菌細胞壁を破壊する。実験室規模の遠心はしばしば粗溶解物から細胞破片を分離するために用いられる。懸濁RNアーゼはしばしば、粗溶解物中の核酸の概ね75%を占める宿主由来RNAを減少させるために使用される。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール又はこの混合物の改変物による有機抽出は典型的には夾雑タンパク質を減少させるために使用される。この時点で、粗溶解物は依然としてかなりの夾雑宿主染色体DNAを含有している。更なる処理が必要である。

上記の、粗溶解物から部分的に精製されたDNAを得るための方法は、医薬品等級のDNAを製造するための最適プロトコールではない。リゾチームやRNA

一ゼのような動物由来の酵素は1つの問題を提示する。動物由来であるために、これら酵素は最終プラスミド製品中にウイルスを夾雑させる可能性がある。有機溶媒も問題が多い。これらの化学品は非常に有毒であり、従って製品が医薬品を意図されている場合、最終投与形態中では除去されていなければならない。更に、これらの溶媒では貯蔵、安全な使用及び危険な廃棄物の処分に関してだけでなく、これら溶媒の除去の証明に関してもかなりの費用が方法の費用に加算される。

粗溶解物から単離されたプラスミドDNAは、最もしばしば塩化セシウム/エチジウムブロミド (CsCl/EtBr) 平衡超遠心によって更に精製される。共有結合で閉じた環状プラスミドDNA、RNA及び染色体DNAに対するEtBrの結合能力の違いによってもたらされる密度差によって、これら3つの異なる核酸はCsCl勾配超遠心で富化フラクションに分離することができる。

CsCl/EtBr勾配超遠心も医薬的に許容可能なDNAの製造方法としては望ましくない。これはDNAを製造するために経済的に規模拡大できる技術ではない。更に、EtBrは、医薬品中ではたとえ痕跡値であっても存在が許容されないような、非常に有毒で、突然変異原性で且つ癌奇形性の試薬であり、そして安全な処分に関して重大な問題を提示する。

染色体DNAを減少させるために粗溶解物を該RNAアーゼで処理し、続いてアルカリ/界面活性剤で処理する上記の方法の変法がある。フェノール:クロロホルムによる有機抽出の後にエタノールによるDNAの沈殿、再懸濁及びDNAのポリエチレングリコール (PEG) 沈殿を行う。また、この方法も医薬品製造になじみにくい時間のかかる実験室規模の方法である。これは、食品医薬品庁 (FDA) が安全であると一般的に認めている (GRAS) ものではない動物由来の酵素、毒性溶媒及び試薬を使用する。

本明細書に開示した新規方法は遺伝子治療のような用途のための医薬品等級DNAの製造に適している。この方法は、超らせん、開環状 (relaxed) 及びコンカタマーを含む種々の形態のプラスミドDNAを分離することができる。この製造方法によって製造されるDNAは、タンパク質、脂質、炭水化物、エンドキシ

- ・RNA、宿主DNA、タンパク質、リポ多糖のような宿主夾雑物を確実に除去する。
- ・RNAアーゼ、リゾチーム及びプロテイナーゼKのような動物由来の外來タンパク質の添加に依存していない。
- ・有毒な有機抽出剤の使用に依存していない。
- ・エチジウムブロミドのような突然変異原試薬の使用に依存していない。
- ・FDAのような医薬品規制当局により安全であると一般的に認められている試薬しか使用していない。

#### 発明の概要

本発明は、細菌、例えば大腸菌、酵母、真菌並びに哺乳動物及び昆虫細胞を含む組換え細胞由来の医薬品に関してFDAや他の国の同様な機関が設定した全ての基準を満たすプラスミドDNAの製造及び精製方法に関するものである。

これまでのDNA単離方法は最後の遠心工程をより安全で且つより規模拡大できる方法に置き換えることに基づいており、その目的はCsCl/EtBr勾配方法の同一品質基準を満たすことである。しかし乍ら、標準的なCsCl/EtBr方法を含めてこれらの方法はどれも、市販を許可される医薬品に必要な同一性、純度、安全性及び効力の品質基準を達成していない。本明細書に記載した発明方法は、細胞から無菌的充填を経て投与に適する最終製品に至るまでの全工程に、より高品質のDNAの製造を可能にする追加的工を採用する。

本発明による単位操作の新規組合せによって、先行しているどの方法とも顕著に異なる方法がもたらされる。本明細書では、下記の特徴を有するプラスミドDNAの精製方法を開示する。

- ・毒性又は動物由来の物質を何も使用していない。
- ・ミリグラム、グラム及びキログラム量に規模拡大できる単位操作からなっている。
- ・細胞ペーストから最後の無菌充填までの全工程を含む点で包括的である。
- ・これまでのプラスミド精製方法では決して達成されなかった、医薬品の許可を受けるのに必要な品質規準 (同一性、純度、効力) を満たす。

ン、染色体DNA及びRNAのような宿主由来の夾雑物を本質的に含有しないか又は痕跡量しか含有していない。これは動物由来又は他に由来する酵素を全く使用しないで製造される。精製はFDAが安全であると一般的に認めている試薬だけを使用して達成される。本発明の製造方法は、大量のDNA (ミリグラム、グラム、キログラム) に規模拡大できる新規な一連の単位操作から構成されており、そして現行の方法よりかなり経済的である。そして、この製造方法で組み合わせられる一連の単位操作は製品DNAを適当なバイアルに無菌充填することなどで完了する。これらの特性によって、本明細書に記載した製造方法は現行の技術水準の方法と明白に識別されそしてこの方法は医薬品等級DNAの製造に特に良好に適する。

#### B. 利点

上記したDNA精製のCsCl/EtBr勾配超遠心の代替法を開発するためにかなりの努力がなされている。これらの方法は全て、最後の超遠心工程をより安全で且つより規模拡大できる方法で置き換えることに基づいている。この目的はCsCl/EtBr勾配方法の同一品質基準を満たすことである。しかし乍ら、標準的なCsCl/EtBr方法を含むこれらの方法はどれも、市販を許可される医薬品に必要な同一性、純度、安全性及び効力の品質基準を達成していない。

組換え技術による医薬品等級タンパク質の製造により、これらのタンパク質が許可医薬品になるためには、宿主夾雑物 (例えば、大腸菌DNA、大腸菌タンパク質、大腸菌RNA、エンドトキシン) が許容され難くそして痕跡値でも厳しく規制されることが教示されている。安全であると一般的に認められていない処理試薬の残留物が同等に厳重な基準に合致しなければならないことは標準的な医薬品の製造から知られている。

プラスミドDNAを製造しそして精製するための本明細書で開示した方法は、大腸菌のような組換え細胞から由来の医薬品に対してFDAや他の国の同様な機関によって設定された基準を全て満たしている。

現行技術水準の方法を超える本発明方法の利点は以下の通りである。

- ・大規模製造になじみ易い規模拡大できる単位操作から構成されている。

本発明によって達成された進歩はこれまでのどのDNA単離方法とも実質的に異なる知的前進である。

本発明によれば、(a) プラスミドDNAを有する細胞を溶解して溶解物を取得し、(b) 不溶性物質除去手段でこの溶解物処理して溶解液 (solute) を取得し、そして (c) この溶解液に分画PEG沈殿 (differential PEG precipitation) 及びクロマトグラフィーを適用してプラスミドDNAを精製する工程を含むプラスミドDNAの製造方法が提供される。

本発明の他の態様では、プラスミドDNAはGRAS試薬を用いて製造され、プラスミドDNAは酵素の不存在下で製造され、プラスミドDNAは有機抽出剤の不存在下で製造され、プラスミドDNAは突然変異原の不存在下で製造され、溶解、処理及び適用工程の規模を拡大してプラスミドDNAを大規模に製造することができ、また、これらの溶解、処理及び適用工程の結果医薬品等級の物質が生成する。

本発明の尚もう1つの態様では、請求項1の方法は、(d) プラスミドDNAを製剤化し、滅菌しそしてバイアル充填して治療投与に適する製品を得る工程を更に含む。滅菌はろ過を含み得る。

本発明のもう1つの特徴によれば、請求項1における細胞は緩衝液中に懸濁されそして希塩基又は希塩基と界面活性剤中に溶解される。緩衝液は酢酸ナトリウムであってもよく、塩基は水酸化ナトリウムであってもよくそして界面活性剤は非イオン界面活性剤であってもよい。細胞を酢酸ナトリウム緩衝液に懸濁して均質な細胞懸濁液を得てもよく、そして細胞を水酸化ナトリウムと非イオン界面活性剤の溶液中で溶解して溶解物を得てもよい。この溶解物はその後の処理の前に陰で中和してもよい。

本発明の更にもう1つの特徴では、請求項1の不溶性物質除去手段はフィルターを含む。

本発明の他の態様では、請求項1の分画PEG沈殿の後にクロマトグラフィーを行い、分画PEG沈殿は、不純物の沈殿物を取得するためのPEGによる第1の沈殿及びプラスミドDNA沈殿物を取得するためのPEGによる第2の沈殿を含み、第1の沈殿は第2の沈殿に先行し、また、第1の沈殿は第1のプラスミド

DNA含有溶液にPEGを加えて低いPEG濃度を得ることを含み、一方第2の沈殿は第2のプラスミドDNA含有溶液にPEGを加えて高いPEG濃度を得ることを含む。

本発明の更に他の態様では、請求項1のクロマトグラフィーはイオン交換クロマトグラフィー若しくはゲルろ過クロマトグラフィー又はこれらの組合せを含み、ゲルろ過クロマトグラフィーはプラスミドDNA含有溶液を、約20,000塩基対のDNA排除限界を有するサイズ排除媒体に約8.0のpH及び約150mMの塩濃度で接触させそしてプラスミドDNAに富むフラクションを回収することを含み、また、イオン交換クロマトグラフィーはプラスミドDNA含有溶液を陰イオン交換体に約8.0のpHで接触させ、約0.7Mから約0.9Mの間で塩勾配で展開し、そしてプラスミドDNAに富むフラクションを回収することを含む。

本発明において、請求項1の工程(b)が、アルコール又はPEGで処理して、溶解液又は溶解液から得られるプラスミドDNA含有溶液からプラスミドDNA沈殿物を回収することを更に含んでもよい。同様に、請求項1の工程(b)は、高濃度塩で処理して、溶解液又は溶解液から得られるプラスミドDNA含有溶液から不純物の沈殿物を除去することを更に含んでもよい。

本発明のもう1つの態様では、請求項1の細胞は大腸菌細胞である。

#### 図面の簡単な説明

図1はVCL-1005のプラスミドマップである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、遺伝子治療のような用途のための医薬品等級DNAを製造するのに適する新規な方法に関するものである。この方法は標準的なCsCl/EtBr勾配方法に取って代わりそしてより高品質の製品を与える。超らせん、開環状(relaxed)及びコンカテマーを含む同一の配列を有する種々の形態のプラスミドDNAを分離することができる。この製造方法によって製造されるDNAは宿主由来の雑物を本質的に全く含有しないか又は痕跡値しか含有していない。精製はFDAが安全であると一般的に認めている(GRAS)試薬だけを使用して達成さ

れる。バイアル製品は、これまでのプラスミド精製方法では決して達成されな

手順	実験室方法	(12) 特表平9-509313 開示した医薬品製造方法
1. 細胞溶解	リゾチーム、 トリス、 SDS を使用	酵素なし、酢酸ナトリウム、 アルカリ性pHのような代替緩衝液 及び/又はSDSの代わりに トゥーイン®80、 GRAS試薬だけを使用
2. 細胞破片の 除去	遠心	ろ過又は遠心
3. 宿主細胞由 来雑物の RNA、 タンパク質、 脂質、DNA の除去	動物由来の 酵素を使用、 有機溶媒を 使用	非プラスミド夾雑物の 高濃度塩沈殿、 PEG沈殿
4. プラスミド に富む粗 溶解物	エタノール 又は同様な アルコール	プラスミドDNAの PEG沈殿
5. プラスミド DNAの 精製	高速遠心、 CsCl/EtBr 勾配	クロマトグラフィー、 カラムは規模拡大可能、 毒性試薬なし

精製後に、プラスミドDNAを品質管理によって分析してこれが仕様を満たしていることを確認する。品質管理の完了後、DNAを無菌バイアル充填物に製剤化する。

#### FDA及び同様な機関によって設定された基準

米国連邦法は、ヒトの治療における医薬物質の使用は連邦政府当局によって承認されることを要求している。実施責任は食品医薬品庁(FDA)の責任であり

FDAはこのような承認を確実にを行うために適切な法令を發布し、これは米国食品医薬品法第301-392条(21 U.S.C. 301-392)に詳記されている。動物の組織から製造される製品を含む生物学的材料についての法令は米国公衆衛生福祉法第26

った、医薬品の許可取得に必要な品質規準(同一性、純度、効力)を満たす。

この製造方法によって、ミリグラム、グラム及びキログラム量の医薬品等級プラスミドDNAが製造される。一般的に、この方法は、プラスミドDNAを有する、振盪フラスコ培養、バイオリクター又は発酵器培養から得られる細胞(例えば、細菌、酵母、真菌、哺乳動物、昆虫又は他の細胞)を溶解して粗溶解物を取得し、ろ過、遠心、任意の形態のクロマトグラフィー及び/又は分画沈殿物を使用して、プラスミドDNAに顕著に富む、部分的に精製されたDNA中間体を濃縮しそして細胞破片のような宿主夾雑物から分離し、クロマトグラフィー及び/又は分画沈殿によって、部分的に精製されたDNA中間体からタンパク質、RNA、脂質及び染色体DNAのような残存夾雑物を除去し、クロマトグラフィー及び/又は分画沈殿によって、DNAの残存夾雑物や残存体の精密分離を達成し、所望のプラスミドフラクションを滅菌して、処理中に混入した空中微生物を除去し、そして医薬品投与形態を適切に送達(deliver)するためバイアルに無菌的に充填する、ことを含む。

この製造方法において、これらの工程はFDAが安全であると一般的に認めている塩、緩衝液、溶媒、抽出剤及び沈殿剤を使用する。エンドトキシン/発熱物質はFDAが許容する値にまで生成物から有効に分離される。宿主染色体DNAは製品DNAから分離される。宿主タンパク質は製品DNAから分離される。種々の形態、すなわち、超らせん、開環状及びコンカテマーのDNAが分離される。この方法は規模拡大可能な単位操作からなっている。この方法は危険な有機廃棄物を生成しない。

標準的な実験室方法を使用するプラスミドDNAの精製はしばしば不完全であり、許容できないレベルのRNA、タンパク質、エンドトキシン及び宿主染色体DNAが残るが、本発明の方法は完全である。宿主DNA、エンドトキシン/発熱物質、RNA及びタンパク質のレベルは検出可能でないか又は痕跡量まで減少する。

次の図表は標準的な実験室方法を本明細書に記載した製造方法の1つの応用例と比較したものである：

2条(42 U.S.C. 262)で規定されている。大部分の外国は同様な承認を要求している。法令は国によって異なっているが、個々の手順は当業者に良く知られている。

#### プラスミドDNA

本発明のプラスミドDNAに制限はない。これらのプラスミドとしては、例えば、原核生物及び真核生物ベクター、クローニング及び発現ベクター、pBR322及びpUCベクター並びにこれらの誘導体等を含むもの、そして種々の複製開始点、例えばpMB1やColE1のような原核生物複製開始点並びに酵母、真菌、昆虫及び哺乳動物細胞での複製を促進するもの(例えば、SV40 ori)のような真核生物複製開始点を有するもの、そしてまたクローニングや発現を促進する多数の遺伝子要素、例えば、選択遺伝子、ポリリンカー、プロモーター、エンハンサー、リーダーペプチド配列、イントロン、ポリアデニル化シグナル等を包含するものが考えられる。ベクター、開始点及び遺伝子要素の選択は必要条件に基づいて変わり、そしてこれは当該技術分野の研究者の技術の範囲内である。同様に、宿主は、細菌、酵母、真菌、昆虫及び哺乳動物の細胞を含む原核生物及び真核生物のなかから選択することができる。好ましい宿主は微生物細胞、特に大腸菌のような微生物である。任意の適当な大腸菌株が考えられる。同様に、多様な構造タンパク質(又はペプチド、ポリペプチド、糖タンパク質、リンタンパク質、アミド化タンパク質等)をコードする遺伝子をプラスミド中に挿入することができ、そしてこれらの遺伝子は、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、ポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド等の配列を構成することができる。これらの配列は化学合成又は遺伝子操作技術(Sambrook, Fritsch, ManiatisのMolecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989年、及びCurrent Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. & Wiley, 1987年、参照、これらは共に参照により本明細書に明示的に含める)を使用して得ることができ、そして更に、これらの配列をプラスミド中に挿入し、そしてその後追加

的な遺伝子操作技術(同上)を使用して宿主細胞中に導入することができる。プ

ラスミドDNA含有宿主の培養については、培養は上記した参考文献中に開示されているような既知の方法を使用して実施することができ、バッチ発酵、補給型バッチ発酵、連続培養、タイプI、II及びIII発酵、無菌発酵、共同発酵、保護発酵等に従って、インキュベーター、バイオリクター、発酵器等が考えられる。培養条件（例えば、培地、温度、pH、時間、攪拌、曝気等）を状況に適合させることは経験的に可能であり、そしてそれは当業者の技術の範囲内である。

本発明の1つの適用では、ヒトの固形腫瘍（VCL-1005）を治療するために設計される医薬品等級のプラスミドDNAが製造される。1つの臨床的な手法は、乳酸加リンガー希釈剤中で処方された陽イオン脂質混合物（例えば、DMRIE及びDOPE）とヒトの主要組織適合性抗原をコードする遺伝子（HLA-B7）（Nabel, Gray J.等, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 90:11307-11311(1993年)）とのコンプレックスを腫瘍に注入することである。この抗原は特定の個人に特有であり、そして臓器移植拒絶のような強い免疫応答に関与する。HLA-B7遺伝子はHLA-B7タンパク質の生成をコードする。このタンパク質の発現は、腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性Tリンパ球応答を身体に生じさせることが期待される。VCL-1005の説明は実施例1で提供し、その構築の説明は実施例2に示し、そしてVCL-1005の発酵方法の特徴は実施例3に示す。

#### 細胞ペースト

プラスミドDNA含有宿主細胞の培養完了後、組織塊体を通常の方法、例えば、特定の適用に依存して、実験室、パイロットプラント又は産業規模の遠心及び/又はろ過によって回収する。これらの細胞は標準的な方法を使用して冷凍貯蔵するか又は直ちに処理することができる。

#### 緩衝液中での細胞の再懸濁

得られた細胞ペーストは、細胞を再懸濁する再懸濁技術を使用して緩衝液中に再懸濁する。緩衝液に制限はない。好ましくは、緩衝液は食品医薬品庁（FDA）が安全と一般的に認めている（GRAS）試薬に含まれる。このような緩衝液は、

酢酸ナトリウム、クエン酸カリウム、一塩基若しくは二塩基リン酸ナトリウム又

利である。実務者に良く知られているように、ろ過は、セルロース、ケイソウ土、セライト（登録商標）ろ過助剤等を含む助剤を使用して不均質又は粘性溶液の流動特性を高めることができる。

本発明の方法に従って溶解物をろ過する材料は、プラスミドDNAをろ液と共に通過させるほど十分に大きい粗み立てたフィルターが不溶性物質の大部分を保持するほど十分に小さい直径を有する穴又は孔を有する。孔のサイズは不規則的であってもよくそして全体的な効果により沈殿物が保持される限り変更可能である。従って、孔のサイズは、好ましくは約0.1~100ミクロンであり、約0.5~50の範囲が特に好ましい。フィルターを製造する材料は合成材料又は有機若しくは無機天然材料でよいが、これは夾雑する核物質を含有する可能性がある天然に存在する有機の植物又は動物製品とすべきではない。フィルター材料はまた有利には、オートクレープ処理可能で、適応性があり(malleable)そして強力であり、そして特有の実験状況に適合できる種々のろ過効率を達成するように層状で組み立てることができる。フィルター材料は好ましくは非吸着性でありそして親水性又は疎水性であることができるが、疎水性はろ液の流れを妨げないようにすべきである。適当なフィルター材料の例は、ガラス、プラスチック若しくは金属スクリーン、多孔性フィルム、セルロース若しくは繊維マット、織布若しくは不織布、又はナイロン若しくはレーヨンのような合成布、例えばミラクロス（Miracloth）（登録商標）（Calbiochem, カタログ番号475855、カリフォルニア州ラジョラ）、即ち22から25μmの平均孔サイズを有する合成不織レーヨン布である。多孔性のフットガラスディスクのような材料を使用することができるが、フィルター材料は好ましくは柔軟性である。ろ過は重力、加圧又は減圧条件下で実施することができる。

#### 清澄ろ液からのプラスミドDNAの沈殿

プラスミドDNAの沈殿物を得るための方法は典型的には、細胞を溶解し、例えばエタノール又はイソプロパノールを使用するアルコール沈殿によってプラス

ミドDNAを採取することと特徴とし、そして温度、一価陽イオンの存在及び遠心の変動要因が関係する。この技術は小規模処理に適するが、プラスミドDNA

はこれらの混合物等を含有し、好ましくは酢酸ナトリウムである。pH及びイオン強度の選択はまさに当業者の技術レベルの範囲内である。

#### 細胞の溶解

この工程では、溶解技術を使用して上記細胞を溶解して、染色体DNA、高分子量RNA、タンパク質及び膜コンプレックスのような非プラスミド不純物を沈殿させる。好ましい態様によれば、細胞はリソチームのような動物又はその他に由来する酵素に頼ることなく溶解される。有利には、溶解は希塩基又は希塩基と界面活性剤中で行われる。塩基及び界面活性剤のいずれにも制限はない。これらはGRAS試薬と同等であることが好ましい。上記のような塩基は水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、重炭酸ナトリウム等であり、一方上記のような界面活性剤は医薬的に許容可能な非イオン界面活性剤、例えば、ポリソルベート（商標Tween（登録商標）で販売されている）、ユニオンカーバイド（Union Carbide）によって販売されているポリオキシエチレンエーテル（Triton（登録商標））等である。NaOHとトウイーン（登録商標）の組合せ物が有利であり、トウイーン（登録商標）80が好ましい。pHとイオン強度の最適化は当業者の技術の範囲内である。アルカリ溶解の代替的な態様は、例えば、フレンチプレス（French Press）、マイクロfluidizer（microfluidizer）等を使用する機械的破壊である。

#### 溶解物の酸性化

任意に、この工程で酸性化技術を使用して上記溶解物を酸性としてアルカリ処理中にもたらされる粘度上昇を減少させ細胞溶解で生じた不溶性物質のその後の除去を促進する。任意の酸を使用することができる。好ましくは、酸は、水酢酸、リン酸、クエン酸等のようなGRAS成分である。pHとイオン強度の適合化は経験的に可能でありそして当該技術分野の技術者の技術の範囲内である。

#### 細胞破片及び他の不純物の除去

この工程で、細胞溶解中に放出される細胞破片や高分子量不純物は、実験室、

パイロットプラント又は産業規模の遠心及び/又はろ過によって通常の方法で除去される。ろ過は、その次の積極的沈殿の前に清澄な溶解物を確保するのに有

の大規模医薬品製造に適用するときには問題になる。アルコールを沈殿剤として使用するとき、再現性のある結果を得るためには温度を厳密に制御しなければならない。アルコールを大容量で使用するときに温度を必要の程度に維持することは費用がかかり且つ操作し難い。更に、方法の規模を拡大するとき、アルコールは爆発性の沈殿タンク及び処理領域（例えば、爆破壁等）を必要とする。この要件は建物の設計及び建築費用を著しく高める可能性がある。これはまた、このような施設を設置できる地域を制限する可能性もある。更に、エタノールと2-プロパノールは危険廃棄物として処理しなければならない。この種の廃棄物処理は高価になる可能性がある。大量のアルコールの使用に依存しない方法を設計することが有利である。

ポリエチレングリコール（PEG）又は他の同様な高分子量ポリオールは、タンパク質及び核酸の回収の両方で沈殿剤及び抽出剤として使用することができる。PEG沈殿はDNAの製造に有利である。PEGは医薬品の許容可能な成分である。アルコール沈殿剤とは異なって、再現性のある結果を得るのに温度を厳密に監視する必要がない。PEGは、アルコールのように爆発性のような問題を与えず、また危険廃棄物の難点もない。

これらの理由により、任意に、アルコール沈殿をPEG沈殿で代替する。この工程で、PEGを清澄ろ液に加えてPEGを高濃度にする。最終濃度を約10%のPEG（重量/容量）にすることが有利であろう（上述）。PEG-8000が好ましい。標準的な沈殿技術の適用並びにpH及びイオン強度の選択は当業者の技術の範囲内である。

#### 部分的に精製したDNAの採集

アルコール又はPEG沈殿の結果、形成されるプラスミドDNAの沈殿物は、実験室、パイロットプラント又は産業規模の遠心及び/又はろ過による通常の方法で分離される。

ろ過は、溶媒を効率的に通過させながらプラスミドDNA沈殿物を回収するの

に効果的な孔サイズの要件を満たす任意のフィルター材料で実施することができる。フィルターの孔サイズは、ろ過性能が効果的である限り、変動可能である。

この用途に最も有効なフィルターはろ過すべき凝集DNAの大きさに依存し、そして凝集物の大きさは、沈殿剤と溶媒に依存する。フィルター、沈殿物及び溶媒のマッチングは経験的に可能であり、そして当該技術分野の研究者の技術者の範囲内である。効果的なろ過は、フィルター上での最大の生成物回収と最小の夾雑物保持によって決定される。適切なフィルターは約0.1~100ミクロン、好ましくは約0.1~50ミクロンの孔直径又は孔直径範囲を有する。この工程のプラスミドDNAろ過用のフィルター材料は、好ましくは、細胞破片の分離に関して上記した物理的特性を有する。即ち、該材料は、合成若しくは無機材料、又は核成分が夾雑しておらず、オートクレープ処理可能で、強くそして適応性のある材料で製造される。

#### 部分的に精製したDNAの緩衝液への溶解及び高濃度塩によるRNA及びリボ多糖不純物の沈殿

本発明の方法全体を通して、プラスミド沈殿物を緩衝液に再懸濁するときには、再懸濁技術を使用し、そして好ましくはGRAS緩衝化剤である緩衝液を使用する。

この工程で、高濃度塩沈殿は沈殿技術を使用しそしてpHとイオン濃度を選択して実施することができ、そしてこれらは当該技術分野の熟練者に既知である。高濃度塩沈殿は夾雑RNAの幾らかそして多くのリボ多糖を除去するのに有効である。塩に制限はないが、好ましくはGRAS成分である。酢酸アンモニウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム等が有用であり、酢酸アンモニウムが好ましい。

#### 沈殿した不純物の除去

高濃度塩沈殿の結果、形成される不純物の沈殿物は、実験室、パイロットプラント又は産業規模の遠心及び/又はろ過による標準的な技術を使用して分離される。ろ過は、不純物の沈殿物を保持し、一方プラスミドDNA溶液の回収を可

能にするのに効果的な孔サイズの要件を満たす任意のフィルター材料で実施することができる。効果的なろ過は、フィルター上での最大の夾雑物回収と最小のプラスミド保持、即ち最適な生成物通過によって決定される。適切なフィルターは

EGの最終濃度が4% (w/v) を達成するのに十分なPEGを添加する。当該技術分野の熟練者に認められているような標準的な沈殿技術を用い且つpHとイオン強度を調整することによって、消極的沈殿はこのような態様で達成される。

#### 沈殿した不純物の除去

沈殿した不純物は、沈殿した不純物の除去に関して上記した通常の遠心及び/又はろ過方法で除去される。

#### 高濃度PEGによるプラスミドDNAの沈殿

上記した分画PEG沈殿に従って、可溶性夾雑物や不純物からプラスミドを析出させるのに十分な高濃度のPEGをプラスミドDNA試料に加える。低濃度PEGカットを実施した後に得られる溶液にPEGを導入することが有利であろう。かくして、4%カットを実施しそしてその後高濃度カットを実施することができる。10%カットは有益であることが証明されよう。この場合には、PEGは最終濃度が10% (重量/容量) になるように試料に添加される。PEG 8000が好ましい。pHとイオン強度の選択及び標準的な沈殿技術の適用は当該技術分野の実務者に明白でありこの工程は首尾良く実施されよう。

#### プラスミドDNAの回収

プラスミドDNAは、部分的に精製したDNAの採取に関して上記した遠心又はろ過によって通常の方法で採取される。

#### 緩衝液中でのプラスミドDNAベレットの溶解

プラスミドDNAは緩衝液、好ましくはGRAS緩衝化剤に溶解され、最終精製用に調製される。

染色体DNA、RNA、リボ多糖及びタンパク質のような多数の宿主夾雑物が

ら分離すると、プラスミドDNAに富むが未だ少量のRNAオリゴヌクレオチド、痕跡量の染色体DNA、タンパク質、エンドトキシン及び処理で残った残留物を含有している可能性のある試料が得られる。本発明によれば、更なる精製は、残存する核酸、巨大分子、小分子量体及び残留物を生成物から除去し、そして更には共有結合で閉じた環状DNA、即ち超らせん単量体をニックのある環状プラ

約0.1~100ミクロン、好ましくは約0.1~50ミクロンの孔直径又は孔直径範囲を有する。この工程のろ過用のフィルター材料は、好ましくは、ろ過に関して上記した物理的特性を有する。即ち、該材料は、合成若しくは無機材料、又は核成分が夾雑しておらず、オートクレープ処理可能で、強くそして適応性のある材料で製造される。

#### 低濃度のPEGによる高分子量DNA及びRNA不純物の沈殿

分画ポリエチレングリコール(PEG)沈殿は、プラスミドDNAの回収を最大にしそして夾雑物の保持を最小にして優れたプラスミドDNA中間体をもたらすことによって有機抽出や他の不利な精製計画に取って代わり得ることが分かった。実施例7では、分画沈殿を有効にするために必要な最適PEG濃度を決定するために実施された滴定(titration)が例示される。この例示に基づいて、当該技術分野の熟練者は同様の滴定を実施して同等に最適のパーセントを確認することができる。

本発明によれば、PEGを使用する分画沈殿は、夾雑物や宿主由来の不純物からのプラスミドの単離を達成するために、プラスミドDNA溶液にPEGを異なる濃度で逐次添加することによって構成される。連続して、PEGは夾雑物や不純物を析出させるのに十分な低いパーセントでプラスミド含有溶液に導入されるか又はプラスミドDNAを落とすのに十分に有効な高いパーセントで導入される。低濃度カットは高濃度カットに先行してもよく、若しくは高濃度カットが低濃度カットに先行してもよく、又は、高濃度カット、低濃度カットそして高濃度カットの順序の一連の沈殿を行ってもよい。

好ましい態様では、約4%のPEGカット(重量/容量)及び約10%のPEGカット(重量/容量)が実施される。4%カットは染色体DNA及びRNAのような不純物を取り出す消極的沈殿であり、一方10%カットによって高度に精製された状態のプラスミドDNAが沈殿する。低濃度PEG沈殿で開始し次いで高バ

ーセントPEG沈殿を行うことが有利であろう。例えば、4%カットは高濃度カットの先に行ってもよいが、この決定は状況によって変わる。PEG-8000が好ましい。このように、プラスミドDNA含有試料(例えば、上記のろ液)に、P

スミド(開環状(relaxed)単量体)及びコンカタマー(超らせん二量体等)から単離する独立の工程として実施することができる。この目的のためにはクロマトグラフィー工程が実施される。イオン電荷、分子サイズ及び/又は他の特性の差異を利用して所望のプラスミドDNA種を精製する。クロマトグラフィーとしては、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及び任意の同様なクロマトグラフィー、並びに、更にはプラスミドDNAの最終精製をもたらすこれらのクロマトグラフィーの任意の組合せも考えられる。

#### ファルマシアS-1000を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによる残存不純物(高分子量のDNA、RNA、タンパク質及びエンドトキシン)の除去

サイズ排除法は単純で且つ再現性のあるクロマトグラフィー方法である。この方法は、夾雑するRNA、染色体DNA、タンパク質及びエンドトキシン、そして更には種々のプラスミドDNA種の正確で且つ再現性のある分離が可能であるため、プラスミドDNAを精製する優れた方法であることが見出された。実施例8では、ゲルろ過法(及び立体排除法)としても知られているサイズ排除法はクロマトグラフィー工程の好ましい実施態様を例示する。

対象の生成物プラスミドは、VCL-1005の分子量、即ち $3 \times 10^6$  kDのオーダーの分子量を有している。このプラスミドが約5 kbの大きさであって、プラスミドはこの大きさの約半分又はこの大きさの3、4若しくは5倍であることもあるが、プラスミドの分子量は約1桁しか異ならない。対照的に、エンドトキシンは50,000 kDの平均分子量を有している。かくして、生成物はサイズ排除カラムでエンドトキシンから容易に分離するであろうと仮定された。更に、アガロース

ゲル分析によっても、問題の主要夾雑物は主として分子量の差異によって生成物と区別できることが示された。これらの特徴を組み合わせることによって、サイズ排除クロマトグラフィーは魅力的な代替的精製法となった。

DNAのクロマトグラフィー精製は新しい1組の問題を提示する。DNA上の表面電荷分布はタンパク質で見られるものと非常に異なっている。タンパク質は

、イオン交換マトリックスと一緒に使用して高分解能分離を達成できる特有の空間荷電フットプリントを有するドメインを有している。しかし、DNAは均一にマイナスに荷電した表面を有しており、タンパク質に共通する明白なドメインを有していない。上記で示唆したように、プラスミドDNAはまた非常に大きい。大部分の市販で入手可能なイオン交換マトリックスは300~1000Åの範囲の孔サイズを有している。プラスミドDNAには少なくとも4000Åの孔が必要である。DNAは大きい孔の陰イオン交換マトリックスに良好に結合するので、RNAは単純な塩勾配でプラスミドDNAから容易に分離される。しかし乍ら、エンドトキシン、プラスミドコンカテマー及び宿主細胞DNAはしばしばプラスミドピークに混入する。これらの理由により、陰イオン交換は部分的精製及び/又はプラスミドDNAの濃縮には有用であり、そしてこのようなものとして考えられるが、この方法は市販で入手できるマトリックスやDNAの構造/電荷に固有の制限によって制限される。

サイズ排除クロマトグラフィーの利点は、医薬品を製造するために設計される方法における最終仕上げ工程としての有用性によって高められる。金属や塩のような小分子量夾雑物は一般的に確実に除去され、再現性のある組成を有する製品が得られる。サイズ排除を検討する決定がなされたのはこれらの理由によるものであった。

ファルマシアS-1000 (Pharmacia, ニュージャージー州ピスカッタウェイ) は非常に高分子量の生成物と適合する分子排除特性を有する市販で入手可能なマトリックスであるので、これをサイズ排除媒体として選択した。この樹脂は20,000塩基対のDNA排除限界を有することがファルマシア (Pharmacia) によって報告されている。ファルマシアS-1000を使用するサイズ排除クロマトグラフィーは残存不純物の除去及び種々のプラスミドDNA種の識別に優れていることが

見い出された(実施例8)。このように、ゲルろ過材料は、非常に高分子量の生成物を分離できる限り制限はなく、そして好ましくはファルマシアS-1000マトリックス又はその誘導体、代替物若しくは等価物である。

この工程に従って、次に、試料をクロマトグラフィーカラムに負荷する。分離

を溶出するのに必要な条件も同様に特定の各分子毎で変動する。一般的に、分子のアフィニティー精製は単純な段階勾配(step gradient)で達成することができ、これは1つの緩衝液(即ち結合緩衝液)による結合と、もう1つの緩衝液(即ち溶出緩衝液)による放出とを含む。分子の結合及び溶出特性が知られていない場合、精製を最適化するように塩又はpHを直線勾配で増加させることが有用である。論理的な一連の溶出条件は、陰溶出、塩基溶出又はカオトロピック剤である。溶出剤を選択した後、溶出条件は濃度、時間及び温度を最適化することによって改善することができる。

更にもう1つの態様では、分子の表面疎水性の差異に基づいて分子を分離するために疎水性相互作用クロマトグラフィーを実施することができる。(逆相クロマトグラフィーは一般的にこれらの同じ特徴を利用するが、有機溶出溶媒を必要とするためあまり好ましくない。) クロマトグラフィーマトリックスと結合した疎水性リガンドと疎水性基間の相互作用がこの化学現象に介在し、そしてそのため脱塩能力に関して作用するのに特に適したものである。マトリックスのタイプ、疎水性基の性質並びに吸着及び溶出の条件は関係分子特有の特性に合わせて調整することができる。

本明細書で提供したクロマトグラフィーの態様のいずれを選択しそして使用するかは当該分野の技術者の技術の範囲内である。クロマトグラフィー方法はシリカ及びポリマーに基づく技術を使用することができる。クロマトグラフィーのこれらの適用はHPLC及びFPLC系と適合する。溶出曲線は、例えばUV吸光度、アガロースゲル電気泳動及び他の分析方法によって、連続して記録するか又は個々のフラクションを調べて決定することができる。

#### フラクションのプール

生成物含有フラクションをプールしてプラスミドDNAの医薬品等級物質を得ることができる。

#### 医薬品等級プラスミドDNA

プラスミドDNAの医薬品等級物質の取得に続いて、この物質を製剤化用緩衝液、上記のような乳酸リナゲル注射用媒体又は他の無害の緩衝化送達媒体中で

は一般的にイソクラティック(isocratically)、即ち単一の移動相を使用して行われる。分子分離用の緩衝液は、当該技術分野の技術者によって認められているような適切なイオン濃度及びpHの水性緩衝液で構成される。試料容量のカラムベッド容量に対する割合は適切でなければならない。流速は適当な速度に維持される。クロマトグラフィーは定型的なクロマトグラフィー技術を使用して実施される。

クロマトグラフィー工程のもう1つの態様では、一定のpHでの分子のイオン電荷又は等電点(pI)に基づいてプラスミドDNA分子を夾雑分子から分離するためにイオン交換クロマトグラフィーを実施する。イオン交換カラムには、支持マトリックスを構成するプラスミドに荷電したビーズ(陰イオン交換体用)又はマイナスに荷電したビーズ(陽イオン交換体用)を充填することができる。分子の電荷密度及びpIで、分子の分離に適する支持マトリックスのイオン容量が決まる。

イオン交換操作は2つの異なる移動相又は緩衝液を使用して(即ち、勾配条件下)行うことができる。開始緩衝液は低濃度塩又は低イオン濃度緩衝液でよい。溶出緩衝液は開始緩衝液よりかなり高いイオン濃度を有してよい。操作pHは試料の溶解度及び支持マトリックスの安定性によって決定することができる。例えば、イオン交換体は約6~11のpH及び約0.3から1.0M NaClの間で展開される直線勾配で流すことができる。水と混合し得る有機溶媒(例えば、アセトニトリル)を使用して保持時間を減少させることができるが、有機化学品廃棄物を貯蔵しないために有機溶媒の使用を回避することが好ましい。

更にもう1つの態様では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して特異的な活性に基づいて分子を分離する。アフィニティークロマトグラフィーは多数の種々のタイプのマトリックスで達成することができる。アフィニティー支持体には、分子と共有結合し得るものと及び支持体に結合したリガンド(このリガンド

で認識し得る分子を精製する)を含有するものが含まれる。アフィニティー支持体の選択性及び結合特性は分離すべき分子によって決定される。

分子をアフィニティークラムに結合させそしてアフィニティークラムから分子

希釈することができ、又はこれを沈殿させるか若しくは濃縮しそしてその後、当該技術分野の熟練者によって認められている既知の技術を使用して製剤化用緩衝液の中に入れることができる。

この段階で、医薬品等級プラスミドDNAを含有する溶液を滅菌してもよい。幾つかの滅菌技術のいずれかを採用することができる。好ましい態様では、滅菌はろ過によって達成される。

ろ液を効率的に通過させるほど十分に大きい、処理中に導入した空中微生物等をフィルター材料が保持できるほど十分に小さい直径を有する孔を特徴とするフィルター材料を使用することができる。従って、孔サイズは好ましくは約0.01~10ミクロンであり、特に好ましくは約0.1~1ミクロンの範囲である。フィルターを製造する材料は合成材料又は有機若しくは無機天然材料でよいが、この材料はプラスミドDNAと結合する傾向が有するべきでない。また、プラスミドDNAと一緒にフィルターを通過するように意図されている物質、例えば製剤化用緩衝液を構成する成分等を制限する傾向があるべきでない。加えて、この材料は非発熱物質であるべきである。好ましい態様では、フィルター材料は約0.2μmの平均孔サイズを有する。フィルターはまた、重要なことに、無菌である。

滅菌は有利には、クラス100フード又は同様な無菌条件下で実施される。プラスミドDNAは無菌ろ過の前か又は後のいずれかで沈殿又は濃縮しそして製剤化用緩衝液に再懸濁することができると考えられる。更に、最後に、最終製品は無菌処理中にバイアルに充填し、このバイアルを密封しそして表示をし、そしてこの医薬品を、例えばインビボ又はエクシボで遺伝子治療法における治療投与に発送することができる。

本発明の具体的な特徴は、以下の実施例を参照して更に容易に理解することができる。これらの実施例は本発明を例示するためのものであって本発明の範囲を例示した特定の態様に限定することを意図するものではない。

#### 実施例1 VCL-1005の説明

VCL-1005はプラスミドDNAから構成されていた。(プラスミドマップは図1として添付する。) このプラスミドDNAはpBR322プラスミドから誘導

されそしてヒトMHC遺伝子、HLA-B7をコードしていた。このプラスミドは細菌発酵で生成された。

共有結合で閉じた環状（主として超らせん）DNA巨大分子は、このプラスミドDNAの1部分によってコードされるカナマイシン耐性タンパク質の発現を要求する選択培地中で増殖した細菌細胞で生成された。このDNAは続いて、本質的に全ての他の細胞材料を除いて精製された。このプラスミドは約5000bpの大きさであり、そしてこれは約 $3 \times 10^6$  g. a. u. の分子量であった。

カナマイシン耐性タンパク質（Tn903）をコードする細菌的に発現された遺伝子に加えて、このプラスミドDNAは、HLA-B7と称されるクラス1の主要組織適合性複合体のH鎖（ヒトHLA B7 cDNA）及びL鎖（チンパンジーB-2ミクログロブリンcDNA）タンパク質もコードしていた。これら2つのタンパク質はバシストロニックmRNAで発現された。このmRNAの真核細胞転写は、3'ロングターミナルリピート（LTR）由来のラウス肉腫ウイルスプロモーター配列及びウシ成長ホルモン遺伝子由来の転写終結/ポリアデニル化シグナル配列に依存していた。H鎖の真核細胞発現は5'キャップ依存性タンパク質翻訳開始部位によって調節された。L鎖の発現は、脳筋炎ウイルス由来のキャップ非依存性翻訳エンハンサー（CITE）配列によって調節された。さらに、細菌細胞におけるこのプラスミドの複製は細菌性複製開始点の存在下で調節された。

精製プラスミドDNAの個々の調製物は、260ナノメートルにセットした光源を有する分光光度計を使用する光学密度吸光度測定によって濃度を測定した（1吸光度単位=50 $\mu$ gの二本鎖DNA）。共有結合で閉じた環状生成物のプラスミドサイズ及びパーセントは、既知の標準品に対するアガロースゲル電気泳動の移動度によって決定した。追加的な特徴付けは、プラスミドDNAの選択的制限エンドヌクレアーゼ消化を使用し、続いてアガロースゲル電気泳動によって、予測さ

れるDNAフラグメントを分離しそしてサイズ分けして行った。コーディング配列の発現は、選択培地（カナマイシン耐性用）中での形質転換細菌細胞の増殖並

4965の間に現れ、そして細菌性複製開始点を含んでいた。これは細菌又は動物細胞のどちらかで発現されることが知られているどんなオープン読み取り枠も含めていなかった。

真核生物遺伝子発現はトリラウス肉腫ウイルス（RSV）3'LTRプロモーター配列によって調節された。この配列はRSVのシュミットリン株由来であり（Swanstrom, R.等, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 78:124~128(1981)）、そしてウイルス塩基番号8673のPvu II部位とウイルス塩基番号9146のBla I部位に囲まれたDNAを単離してクローン化した。真核細胞での異種遺伝子の発現を調節するためにこのプロモーター配列を使用することはゴーマン（Gorman）C. 等によって10年以上前に記載された（Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 79:6777~6781(1982年)）。VCL-1005プラスミドの構築に使用したRSV DNAフラグメントはpRSV  $\beta$ -グロブリンから取得した（Gorman, C.等, Science 221: 551~553(1983年)）。この調節配列はトリレトロウイルス中に見られたが、この3'LTRはトリ又は哺乳動物細胞のどちらでも固有の発癌性活性を有していないことが試験されそして証明された（Westphal, C.等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:411~416(1985年)）（Mahon, M.等, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 85:1165~1168(1988年)）（Overbeek, U.等, Science 231:1574~1577(1986年)）。VCL-1005中のRSV LTRプロモータードメインは塩基対1~529に相当した。これには、下流のコーディング配列の高レベルの真核細胞発現を行うようにこの調節配列を修飾している化学合成オリゴヌクレオチドDNAの56塩基対領域が含まれていた。このオリゴヌクレオチドによってRSV DNA配列中に本来見られるポリアデニル化シグナル配列（即ち、Xba I制限エンドヌクレアーゼ部位、TCTAGAによってAATAAA）が除去された。このオリゴヌクレオチドはまた、翻訳開始コードン、ATGの近くに強力な翻訳シグナル配列を導入した（Kozak, M.等, Nucleic Acids Res. 15:8125(1987年)）。更に、この合成オリゴヌクレオチドを使用して、5'及び3' DNA要素の両方のサブクローン化を助けるために多数の制限エンドヌクレアーゼ部位（即ち、SalI, HindIII及びNcoI）も組み入れた。ヒトHLA-B7及びB-2ミクログロブリンタンパク質のクラス1 MHCコー

びにインビトロ細胞培養物中で増殖させVCL1005プラスミドDNA DMR I E/DOPEでトランスフェクションした真核細胞でのHLA B7のH及びL鎖のFAC抗原提示アッセイによって測定した。

#### 実施例2 VCL-1005の構築

VCL-1005は、高コピー数細菌プラスミドDNA中にクローン化したDNAの独立断片を使用して構築した。このプラスミドは、その配列が細菌細胞での高レベル複製を促進し、細菌細胞の培養中に支配的な選択的耐性タンパク質を発現し、そして真核細胞中に導入したとき2つのクラス1 MHC成分タンパク質、即ちHLA-B7及びB-2ミクログロブリンの高レベル発現を行うように設計された。各成分は、標準的な分子生物学方法及び市販で入手可能な制限エンドヌクレアーゼや他のDNA修飾酵素（即ち、大腸菌（クレノウフラグメント）DNAポリメラーゼ、バクテリオファージT7 DNAポリメラーゼ、バクテリオファージT4 リガーゼ等）を使用してバックボーンプラスミド中にサブクローン化した。サブクローン化した生成物は、制限エンドヌクレアーゼマッピング作成及び結合DNA配列分析の両方によってフィデリティ及び配向（必要な場合）について試験した。最終的なDNAプラスミド医薬品はDNAの両ストランドに関して完全に配列決定された。後のVCL-1005DNAのドメインに対する言及は全て、任意に#1と称しているRSVプロモーター5'末端由来の第1のヌクレオチドに基づいている。

バックボーンプラスミドDNAは、分子生物学研究室で広く使用されそしてその複製開始点が天然に存在する細菌プラスミド、Coli E1から取られているベクター、pBR322から誘導された（Bolivar, R.等, Gene 2:95~113(1977年)）。VCL-1005プラスミドで使用したpBR322の952塩基対フラグメントは、ユニークなEcoRI制限エンドヌクレアーゼ部位をpBR322塩基1としたとき、pBR322の塩基番号2244（AccI制限エンドヌクレアーゼ部位、プラント末端）から塩基番号3193（BspHI制限エンドヌクレアーゼ部位）までの領域に相当した。この

バックボーンプラスミドフラグメントはVCL 1005 DNAの塩基番号4013から

デ

ィング配列は上記したRSV LTRの3'に位置していた。単一のバシストロニックmRNA分子の真核生物転写はRSVプロモータードメインによって調節された。このバシストロニックmRNAの翻訳はキャップ依存性及びキャップ非依存性リボソーム認識配列の両方の影響を受けた。キャップ非依存性シグナルはネズミ脳筋炎（EMC）ウイルスゲノムから取得され、そしてHLA-B7のH鎖とL鎖の間でクローン化された。

#### 実施例3 VCL-1005の発酵

発酵方法は、ブラウン（Braun）発酵器中で、TB培地（完全、抗生物質カナマイシンを含有する）中10Lのバッチ発酵として実施した。

##### a. 接種物の調製

抗生物質カナマイシンを含有する大腸菌株DH10Bグリセリンストックの凍凍分別物0.1mlを使用して、1LのTB培地（完全）を含有する2Lフラスコに接種した。TB培地は、イーストエキストラクト24g及びトリプチンゼプトン12gを2Lの振とうフラスコに加えて調製した。次に、900mlの脱イオン水をこのフラスコに加えそしてよく混合した。内容物が全て溶解したとき、グリセリン4mlを加えそしてよく混合した。フラスコに栓をしそして栓をステリガード（Sterigard）紙で覆った。次に、フラスコを121℃以上で30分間オートクレーブ処理した。培地が冷えた時、無菌カナマイシン50mg及び無菌リン酸塩溶液100mlを加えた。リン酸塩溶液は、500mlフラスコ中脱イオン水100mlに $K_2HPO_4$  12.5gと $KH_2PO_4$  2.3gを溶解して調製した。このフラスコに栓をしそして栓をステリガード紙で覆った。次に、フラスコを121℃以上で30分間オートクレーブ処理した。カナマイシンとリン酸塩溶液を加えて、TB培地は完全になった。接種したフラスコは、振とう器インキュベーター室内で37℃及び300~400rpmで10~20時間振とうした。

##### b. 発酵器の準備

ブラウンバイオスタット（Braun Biostat）ED発酵器を水酸化ナトリウム溶液、続いてリン酸洗浄液で洗浄し、次いで脱イオン水で徹底的にすすいだ。p



Hプロブは、pH7.0の標準緩衝液、次いでpH4.0の標準緩衝液中に浸漬し

て校正した。発酵器に6Lの脱イオン水を加えた。次に、イーストエキストラクト粉末240g及びトリブチカーゼペプトン120gを発酵器に加えた。攪拌機を作動させて粉末の溶解を促進した。次に、グリセリン40ml及び消泡剤1.5mlを発酵器に加えた。発酵器の壁を脱イオン水ですすいで容量を9Lにした。発酵器の内容物は、コントロールユニット上でパッチコントロール自動サイクルを使用して121℃で30分間滅菌した。

#### c. 発酵条件

発酵器は、次のコントロールループ、すなわち、pH、溶解酸素（DO）及び温度を使用してモニターした。温度は30℃±0.5°にコントロールした。攪拌速度は600rpmに設定しそして気流コントロールは1v/v±0.1v/vに設定し、pHは7.0±0.5であった。

#### d. 発酵接種

発酵器のコントロールループは全て正しく作動することが確認された。発酵器のヘッドプレートの隔壁を、3フィートから4フィートで、3/32内径の3つのシリコン管が連結されている滅菌した製造者の接種用部品で突き刺した。1個の無菌管を使用して1Lのリン酸塩溶液を発酵器中に導入した。第2の無菌管を使用して接種物を発酵器中に導入した。第3の無菌管は、必要な場合pHをコントロールするために残しておいた。溶液は全て蠕動ポンプを使用して発酵器中に導入した。無菌カナマイシン溶液50mg/ml、即ち500mg/発酵器をリン酸塩溶液に加えた。

#### e. 発酵及び細胞採取

発酵は自動コントロール下で上記したパラメータで進めた。発酵ブイオン試料は時々採取バルブから取り出し、発酵はOD600が20又はそれより多くなったとき完了した。細胞は、風袋を測定した1Lの遠心瓶中に採取バルブからブイオンを取り出すことによって発酵器から採取した。4900rpmまでで30分間遠心して細胞を濃縮した。上清液を傾倒し、そして瓶の重量を測定して細胞収量を測定した。

、そしてその後等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）を加えた。このフェノール等の組合せ物を磁気攪拌機を使用して室温で30分間攪拌した。上記の組合せ物を5000rpmで暫時遠心して水と有機相の分離を促進した。上部の水性相を集め、そして2容量の-20℃のエタノールを添加して混

合しそして-20℃で少なくとも1時間又は一夜インキュベートしてDNAを沈殿させた。

沈殿物含有物を12,000rpmで30分間遠心した。上清液を捨て、そして15分間残っているベレットの水気を切り、そしてその後垂直に立てて5分間風乾した。ベレットはTE緩衝液中に、細菌の最初の湿潤重量当たり0.5mlを使用して再懸濁した。

再懸濁ベレットにpH5.2の酢酸ナトリウムを加えて1.1Mの最終濃度にした。この溶液に、最終濃度が4%PEGになるように1.6M NaCl中30%のPEGを加えた。このPEG含有物質は4℃で少なくとも8時間インキュベートした。

#### d. 最後のDNA沈殿

4%PEG沈殿に続いて、この物質を12,000rpmで30分間遠心した。上清液を清浄な瓶に傾倒しそしてPEGの最終濃度が10%になるように1.6M NaCl中30%のPEGを更に追加した。このPEG含有物質を4℃で少なくとも8時間インキュベートした。次に、これを上記したようにして遠心した。ベレットの水気を切り、そしてその後少量（<10ml）のTE緩衝液中に再懸濁した。10分の1容量の3M酢酸ナトリウムpH5.2を加え、そしてその後2容量の冷（約-20℃）エタノールを加えた。この混合物を-20℃で少なくとも1時間インキュベートした。これを12,000rpmで4℃で30分間遠心しそして少量のカラム緩衝液（詳細については下記参照）中に再懸濁した。

#### e. ゲルろ過クロマトグラフィー

ファルマシアS-1000（Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ）サイズ排除タンデムカラムを2つのファルマシアXK26/100カラム（Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ）中に注ぎ最終ベッド高を80〜85cm（2.6×80cm）とし、各々は約900mlの総カラム容量となった。これらのカラムを個々

#### 実施例4 VCL-1005の精製

VCL-1005は次のプロトコルを使用して精製した。

#### a. 細胞溶解

細胞ペーストは、室温で磁気攪拌機を用いて湿潤細菌重量1グラム当たり7mlの溶液I（61mMグルコース+25mMトリス緩衝液pH8.0+10mM EDTA pH8.0）中に完全に再懸濁した。この溶液に、湿潤細菌重量当たり14mlの溶液II（0.2N NaOH+1%SDS）を加え、そして清澄な粘性溶液になるまで攪拌した。この溶解した細胞溶液は、染色体DNAの切断を防ぐためそれ以上攪拌しないで氷上で10分間インキュベートした。この溶解した細胞溶液に、湿潤細菌重量当たり10.5mlの氷冷溶液III（3M酢酸カリウム、pH5.0）を加え、上下を逆にし、激しく攪拌し、そして氷上で10分間インキュベートした。

#### b. ろ過

溶解物は2層のミラクロス（登録商標）を通して注意深くろ過して細菌細胞壁を除去した。これを、各回16層のミラクロス（登録商標）を通して更に3回繰り返した。粗DNAろ液は、0.6容量の冷（約-20℃）イソプロパノール約200mlを一度に加えそして攪拌して沈殿させ、そして室温で1〜2時間インキュベートした。粗核酸沈殿物は5℃で12000rpmで30分間遠心して集めた。上清液を捨てた後、15分間ベレットの水気を切り、そしてその後垂直に立てて5分間風乾した。DNAベレットは、細菌の最初の湿潤重量当たり約1mlのTE緩衝液（0.01Mトリス塩基+0.001M EDTA pH8.0）を使用してTE緩衝液中に完全に再懸濁した。

#### c. RNA及びリボ多糖の除去

ベレットを上記したようにしてTE緩衝液に再懸濁した後、細菌の最初の湿潤重量当たり0.29グラムの酢酸アンモニウムを最終濃度が2.5MになるようにDNA/TE再懸濁物中に溶解した。必要な場合、TE緩衝液を更に追加して容量を補正した。この混合物を氷上で15分間インキュベートし、そしてその後この工程を一夜継続するか又は4℃に変えた。

この混合物を10,000rpmで20分間遠心した。上清液は0.8μの膜を通してろ過し

に1方向に圧力充填し、上下を逆にしそして平衡化と操作のために連続して連結した。このカラムは、TE+150mM NaCl、pH8.0中で平衡化し、そして0.75ml/分又は17cm/時間の流速で流した。

総カラム容量の1%未満の、上記緩衝液に溶解した部分的に精製したプラスミドDNAを0.22ミクロンの無菌非発熱物質シリンジフィルターでろ過し、そして

カラムに負荷した。カラム操作及びフラクション採取はファルマシアFPLC（Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ）で自動化した。

生成物（超らせん単量体）は0.3から0.4カラム容量で二量体の直後に溶出し始めそして僅かに二量体と重複した。生成物はカラムへの全負荷量に依存して0.5〜0.6カラム容量で溶出を完了した。

生成物溶出領域でフラクション（カラム容量の約0.5〜1%）を集め、そして0.8%アガロースゲルで分析した。生成物溶出の正確な領域はゲル分析から決定した。適当なフラクションをブールし、そして2容量の冷エタノールを用いて-20℃で一晩沈殿させた。

エタノール沈殿フラクションを12,000rpmで4℃で30分間回転させた。薄層状流フード中で15分間ベレットの水気を切り、上下を逆にしそして5分間風乾した。このベレットを、最終濃度が約1mg/mlになるように米国薬局方（USP）の注射用乳酸加リンガー液に再懸濁した。これによってプラスミドDNAの医薬品等級物質が構成された。試料をQCに提供し、そして残りは貯蔵するか又は投与及び無菌充填用に濃度を調整した。

クロマトグラフィー後に、カラム及びFPLCを1カラム容量の0.1M NaOHで衛生的にした。

実施例5 安全であるとして一般的に認められていない試薬を使用しないプラスミドに富む粗溶解物の製造

湿潤細胞ペースト200グラムに、0.2M酢酸ナトリウム、pH8.2を600ml加えた。この混合物を約5〜10分間静かに混合して均質な細胞懸濁液を得た。この均質な細胞懸濁液に0.2M水酸化ナトリウムと1%トウイーン（登録商標）80（w/v）の溶液500mlを加えた。この懸濁液を約5〜10分間静かに混合して溶解物を得

た。脱イオンH<sub>2</sub>Oを溶解物に加えて容量を2000mlにした。次に、氷酢酸を加えてpH5.0とした。その後、ろ過によって細胞破片を除去した。ろ液に冷(約-20℃)2-プロパノール1200mlを加えてプラスミドに富み部分的に精製されたDNA沈殿物を得た。

実施例6 アルコール又は遠心を使用しないプラスミドに富み部分的に精製されたDNAの製造

#### a. 細胞溶解

まず、大腸菌細胞200グラム(湿潤重量)を約4~8℃で一晩解凍した。解凍した生物集団を10リットルのカルボイに移した。次に、0.05M EDTAを含む溶液Iを1.4リットル加え、そして細胞を均質になるまで混合した。(溶液I=0.025Mトリス塩基、0.061Mグルコース、pH8.0)。

次に、カルボイ中の細胞に0.05M EDTAを含む溶液IIを2.8リットル加えた。得られた懸濁液はカルボイを繰り返し反転させて混合した。カルボイを水気のある氷中に10分間置いた。(溶液II=1% SDS、0.2M NaOH)。

次に、0.05M EDTAを含む溶液III(添加前に4~8℃で冷却保持した)を2.1リットル加え、そして得られた溶液は、羊毛状の物質が均一に分布するまでカルボイを繰り返し反転させて混合した。カルボイを水気のある氷中に10分間置いた。(溶液III=3.0M酢酸カリウム、pH5.0)。

#### b. ろ過

溶解物は、プフナー漏斗装置中の2層のミラクロス(登録商標)を通して注いで大きい組織片を除去した。これを、各回16層のミラクロス(登録商標)を通して更に2回繰り返した。粗ろ液の最終容量は5.05リットルであった。

#### c. PEG-8000によるプラスミドDNA沈殿

次に、粗ろ液に600グラムのPEG-8000を攪拌しながら加えた。0.01Mトリス塩基、0.05M EDTA、1.6M NaCl、pH8.0を用いて容量を6.0リットルにした。溶液の最終pHは測定しなかった。これによってPEG-8000の最終濃度は10%(w/v)になった。ガラス製のカルボイを4~8℃に移しそして一夜攪拌した。

この工程で、ろ液1.5リットルを工程eから回収した。残っているセライト(登録商標)は、ろ液をワットマンNo.1等価物、続いて0.8ミクロンのニトロセルロース膜を連続して通過させてろ液から除去した。

次に、冷(約-20℃)2-プロパノール0.9リットルを最終ろ液に加えて、そして得られた溶液を-20℃の冷凍庫に1時間入れた。沈殿したDNAをソーバル(Sorvall)RC3中9000rpm、4℃で45分間遠心して集めた。上清液を捨て、ペレ

ットの氷を切り、そしてその後約15分間風乾した。回収されたプラスミドDNAの約3分の1を含むペレットを5mlの0.01Mトリス塩基、0.01M EDTA、0.15M NaCl、pH8.0中に溶解した。

この試料を、0.01Mトリス塩基、0.01M EDTA、0.15M NaCl、pH8.0中で前もって平衡化させたタンデム(2.6cm×100cm)ファルマシアS-1000カラム(総カラム容量=900ml)(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカッタウェイ)に直接付した。このカラムは0.75ml/分すなわち17cm/時間の流速で流した。

次に、250mlの溶出容量から650mlまで5mlフラクションを集めた。これらのフラクションを標準的な0.8%アガロースゲルで分析し、そしてフラクション28~40を主として単量体の超らせんプラスミドDNAとしてプールした。最終収量は、95%以上閉じた環状DNAが2.1mgであると決定された。

これらの工程を残りのプラスミド濃縮物について繰り返し、そして2.4mgと3.1mgが回収され、総回収は7.56mgとなった。

実施例7 フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール及び同様な有機抽出剤による有機抽出の代わりのPEG-8000の使用

分画PEG沈殿は、プラスミドDNAの最適な回収及び夾雑物の最小の残留に関して有機抽出及び他の精製系を代替し、部分的に精製された優れたプラスミドDNA生成物が製造されることが確認された。

#### a. PEG-8000の測定

幾つかのPEG-8000値を調べてプラスミドDNAを沈殿させる適切な濃度を決定した。

#### d. プラスミドDNAのろ過

一夜インキュベートした後、分析等級のセライト(登録商標)ろ過剤(Celite Corp.、カリフォルニア州ロンボク)120グラム(20グラム/リットル)を10%PEG-8000プラスミドDNA沈殿物に加え、そして室温で攪拌を継続した。これを混合する一方、ワットマンNo.1と同等の直径10インチのフィルター

で覆った直径約8インチの広いメッシュポリプロピレンスクリーンを用いて10インチのプフナー漏斗を組み立てた。これを、TE緩衝液中のセライト(登録商標)を約1cm適用して予め被覆した。予め被覆した後、6リットルの10%PEG-8000で部分的に精製したDNA沈殿物を吸引してプフナー装置に適用した。ろ過後、プラスミドDNA沈殿物を含有するセライト(登録商標)ケーキが比較的乾燥するまで(10分間)吸引を続けた。

#### e. プラスミドDNA沈殿物の回収

セライト(登録商標)ケーキを取り出しそして1リットルの0.01Mトリス塩基、0.05M EDTA、pH8.0中に懸濁し90分間攪拌した。この工程によって、ケーキ上に集められたプラスミドDNA沈殿物は溶解された。この懸濁されたケーキに酢酸アンモニウムを最終濃度が約2.5Mになるように加えた。約4~8℃で30分間攪拌を継続した。この時点での容量は1.5リットルであった。酢酸アンモニウムによってリボ多糖とRNA不純物の一部が沈殿した。得られたスラリーは、上記したのと全く同じワットマンNo.1と同等のフィルターを有するプフナー装置でもう1度ろ過した。この工程で、酢酸アンモニウムで沈殿した不純物はセライト(登録商標)ケーキで捕獲され、そしてプラスミドDNAはろ液中に通過した。

#### f. プラスミドDNAの最終精製

(実験のこの時点で、材料をできるだけ早くファルマシアS-1000カラム(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカッタウェイ)にかけて収量及び不純物の分布範囲を決定するために、2-プロパノール沈殿によってプラスミドDNAろ液を濃縮することに決定した。実地的には、プラスミドDNAは陰イオン交換、限外ろ過又は第2のPEG-8000沈殿で濃縮されるであろう。)

上記実施例6に記載した、溶液III後のろ過で精製された清液な溶解物がこの実験の出発物質であった。実験対照は0.7容量の2-プロパノールで処理した。1.6M NaClを含有する30%のPEG-8000ストック溶液を調整しそして上記粗溶解物に加えて、下記表に示す最終PEG濃度を得た。

処理群	細胞溶解物の容量
1. IPA 対照-0.7×容量	100ml
2. 5% PEG 8000	100ml
3. 7.5% PEG 8000	100ml
4. 10% PEG 8000	100ml
5. 12.5% PEG 8000	100ml

得られた溶液を良く混合しそして10℃の水浴中に一夜入れた。

次に、溶液を、10,000rpmのGSAローターを使用してソーバルRC3中で40分間遠心した。瓶の水気を切り、そしてペレットを5mlのTE-0.7M NaCl中に再懸濁した。次に、プラスミドDNA溶液1mlを、2容量のエタノールを用いて-70℃で2時間再度沈殿させた。(これは単に、0.8%アガロースゲルによる分析用試料の調製工程として実施した。PEGが試料中に残っているとDNAがゲル上ですじになる原因になる可能性がある。)核酸の濃度は260nmでのUV吸光度を測定して推定し、そして結果を下記に示す。

処理群	A260/m	100mlに基づく 総A260
1. IPA 対照-0.7×容量	0.45239	228.46
2. 5% PEG 8000	0.0921	46.51
3. 7.5% PEG 8000	0.14294	72.18
4. 10% PEG 8000	0.17007	85.89
5. 12.5% PEG 8000	0.1505	76.00

ゲルは、5%PEG-8000ではほんの少量の単量体プラスミドしか沈殿しないことを示した。しかしながら、より高分子量の夾雑物はより低いPEG濃度で優先的に沈殿した。10%PEGで、プラスミドは十分に沈殿した。これらの結果は、A260読み取りに関連させるとき特に意味があった。

より顕著に吸収性の物質(約3×)はPEG法より標準的な2-プロパノール法によって沈殿した。しかしこれらの方法は共に、アガロースゲル実験に基づいて同じ量の生成物(超らせんプラスミド)を沈殿させることが観察された。これ

らのデータによって、PEGは、他の不純物は沈殿させないで、アルコールと同じ位有効に生成物を落下させることが確立された。

#### b. PEG-8000カット

より高分子量のDNAはより低いPEG濃度で優先的に沈殿するという特性を利用して一連のPEGカットを実施した。

-20℃の2-プロパノール0.7容量を用いて-70℃2時間で溶解物1000mlから部分的に精製したDNAを沈殿させた。次にこの溶液を10,000rpmのGSAローターを使用してソーバルRC3中で40分間遠心した。得られたペレットの水気を切りそして風乾した。次に、これらのペレットをTE緩衝液に溶解しそして一緒にブールした。10mlを2-プロパノール対照として取り出した。この材料の残りを1.11M酢酸ナトリウムとしそして4×50mlのコニカル試験管に等量(各々約10ml)に分けた。次に、1.6M NaCl中30%のPEGを各試験管に加え、PEG-8000濃度を3%、4%、5%及び6%PEG-8000とした。混合後、これらの材料を10℃の水浴中で一夜インキュベートした。これらのペレットの水気を切り、そしてその後TE緩衝液5mlに溶解しそしてアガロースゲル分析用に10マイクロリットルを取り出した。残存材料、即ち上清液を1.11M酢酸ナトリウムとし、そして全容量を10mlに調整した。観察されたA260読み取りはこの項の下記表に示す。

次の工程で、1.6M NaCl中30%のPEGを各上清液含有試験管に加え、10%の最終PEG-8000濃度とした。混合後、内容物を10℃の水浴中で一夜インキュベートした。得られたペレットを遠心して集めそしてTE緩衝液10mlに溶解した。得られたA260読み取り値を以下に示す。

速で流した。

プラスミドDNAは細胞ペースト200gを使用して調製した。エタノール沈殿によってDNAを濃縮し、試料を10mlのTE及び150mM NaCl、pH8.0中に溶解し、そしてカラムに付した(ベッド容量の1.1%)。

4つのピークが分離されそして標準的なアガロースゲル方法によって分析された。ピーク1は染色体のものであり、ピーク2は二量体と超らせんの混合物であり、ピーク3はRNAであり、そしてピーク4はゲル上に何も見られずA260:A280比が1.3であったのでタンパク質であると思われる。

#### b. PEG沈殿とS-1000サイズ排除クロマトグラフィーの方法の統合

標準的なプロトコールと、4%PEG沈殿及びS-1000サイズ排除カラムを採用した3つの変法を平行評価した。まず、細胞ペースト189グラムを、材料を実験群に分ける前に、上記の実施例4に記載したようにして酢酸アンモニウム工程で処理した。4つの処理の基本的な差異は下記表に記載する。

処理群	変法
I	対照-標準的な変法
II	4%PEG Ppt+RNアーゼ+PK+フェノールなし
III	4%PEG Ppt+RNアーゼ+PK+フェノール
IV	4%PEG Ppt+酵素なし+フェノールなし

これらの実験によって、4/10PEG 8000カット(4%PEG Ppt)を用いると、フェノール/クロロホルム抽出(フェノール)、プロテイナーゼK(PK)及びRNアーゼを省くことができることが確認された。

上記処理後に、標準的なクロマトグラフィー方法によって材料をQセファロースHPカラム、陰イオン交換体(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ)を通して。

Qカラムから得た沈殿プラスミドをTE+0.15M NaClに溶解しそしてS-1000カラムで分離した。これらのカラムはTE+0.15M NaCl中0.75ml/分で流した。これらの実験から得られるS-1000のプロフィールによって、処理群IVが処理群I~IIIと同様に有効であることが証明された。即ち、4/10PEG8000

試料	容量(ml)	100倍希釈	A260/ml	総
			A260	A260
3% Peg 8000ペレット	10.00	1.0043	101.43	1014
4% Peg 8000ペレット	10.00	1.0226	103.28	1033
5% Peg 8000ペレット	10.00	0.91103	92.01	920
6% Peg 8000ペレット	10.00	0.85074	85.92	859
10/3% Peg 8000カット	10.00	0.39519	39.91	399
10/4% Peg 8000カット	10.00	0.21042	21.25	213
10/5% Peg 8000カット	10.00	0.09091	9.18	92
10/6% Peg 8000カット	10.00	0.08112	8.19	82
1 PA 対照	10.00	1.109	112.01	1120

次に、全処理試料を0.8%アガロースゲルで分析した。

アガロースゲル分析によって、3%PEGはニックのあるプラスミドは沈殿させるが生成物は沈殿させないことが示された。同様に、4%PEGもニックのあるプラスミドと高分子量DNAを沈殿させることが観察された。これらの両PEG濃度でかなりの量の夾雑RNAが沈殿した。5%PEGで、かなりの量の生成物が沈殿していた。これらの結果から、4%PEGカットに続いて10%PEGカットを行うと最高品質の生成物が最良の収量で得られるであろうと結論した。

実施例8 種々の形態のDNAのサイズ排除分離並びにプラスミドDNAからのRNA、染色体DNA及びタンパク質の分離

宿主夾雑物及びプラスミドDNA種の優れた分離を得るためにサイズ排除クロマトグラフィーを確立した。

#### a. 初期実験

20,000塩基対のDNA排除限界を有するファルマシアS-1000サイズ排除媒体(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ)をファルマシアXK26/100カラム(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ)へ注ぎ、最終ベッド高80cm(2.6×80cm)とし、総カラム容量は425mlとなった。このカラムは1方向に圧力充填し、そして平衡化および操作時は逆方向にした。カラムをTE及び150mM NaCl、pH8.0中で平衡化させそして1.5ml/分又は17cm/時間の流

カットを使用することによって有機抽出並びに動物酵素RNアーゼ及びプロテイナーゼKでの処理は余分になることが見いだされた。更に、S-1000カラムを使用すると、全ての場合に、染色体DNA、二量体及び超らせんプラスミド、RN

A並びにタンパク質の優れた分離が得られることも観察された。

アガロースゲル電気泳動はこれらの結果を裏付けた。4つの処理群の分析で二量体及び超らせんプラスミドの分離における小さい変動が認められ、処理群I及びIIIでは処理群II及びIVより多くの二量体が得られた。4/10PEG 8000カットは、他の方法では同じ精製レベルを得るには有機抽出並びにプロテイナーゼK及びRNアーゼ処理が必要であるので、優れていることが明らかであった。更に、実質的な面がS-1000カラムの使用によって達成されることも明白であった。エンドトキシン及びサザンブロット分析によっても同様にこれらの結果が実証された。

#### 実施例9 種々の形態のDNAを分離するタンデムサイズ排除カラム

プラスミドDNAは上記実施例8に記載したようにして調製し、そしてファルマシアS-1000サイズ排除媒体(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ)を充填した2つのファルマシアXK26/100カラム(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ)を含み、約900mlの総タンデムカラム容量となっているタンデムサイズ排除カラムに付した。種々の形態のDNAの分離は直列に連結されたカラムの分離能の増加によって高められた。

実施例10 種々の形態のDNAのイオン交換分離及びプラスミドDNAからのRNAの分離

この特別の実施例では陰イオン交換媒体QセファロースHP(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカッタウェイ)が静止相であった。分離は、pH8.0のEDTAを含むトリス緩衝液中のNaClを0.7M~0.9Mの勾配で展開して達成された。負荷物は本明細書に記載した標準的な実験室の方法によって調製した。RNAはカラムを直接通過し、一方種々の形態のDNA(ニックのあるプラスミド、超らせんDNA)は塩勾配で分離された。

#### 実施例11 サイズ排除クロマトグラフィーによるエンドトキシンの除去

プラスミドDNAは上記実施例8に記載されたようにしてサイズ排除クロマト

グラフィーによって分画した。試料負荷物中のエンドトキシン濃度はLALで測定したとき約300,000 EU/プラスミドDNA $\mu$ gであった。プラスミドプール中のエンドトキシン濃度は約30~100 EU/プラスミドDNA $\mu$ gであった。

実施例12 医薬品製造方法によって製造したプラスミドDNA製品の効力

本明細書に記載した医薬品製造方法によって精製したVCL-1005プラスミドDNAの効力は、DMRIE/DOPEを使用する脂質介在性インビトロトランスフェクション後に、HAL細胞（ヒトメラノーマ細胞系）でのHLA-B7遺伝子発現によって測定した。同様な方法で精製したVCL-1005の作用参照（working reference）を陽性対照として使用し、そして試験試料の相対的効力を測定した。

トランスフェクション前日に、6ウエルプレート中にウエル当たり200,000~400,000個のHAL細胞を接種した。細胞はトランスフェクション前に概ね80~90%の集密的細胞単層であった。DNAはOpti-MEMのような血清減少培地中で10 $\mu$ g/mlに希釈しそしてDMRIE/DOPEは20 $\mu$ g/mlに希釈した。次に、これらを1つのポリスチレン管中で一緒にしてトランスフェクション用のコンプレックスを形成させた。1ウエル当たり1mlのコンプレックス（5 $\mu$ g DNA、5 $\mu$ g DMRIE、5 $\mu$ g DOPE）、を用いて上記細胞をデュプリケート又はトリプリケートでトランスフェクションさせた。細胞は37℃、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。トランスフェクションして1~4時間及び24時間後に細胞に新たな培地及びウシ胎児血清を補充した。トランスフェクションして48時間後に細胞を採取した。細胞表面でのHLA-B7遺伝子発現は抗HLA-B7、次いで蛍光第二抗体（抗マウスIgGモノクローナル抗体R-フィコエリシン複合体）で標識した。細胞の免疫蛍光染色をフローサイトメトリーで分析した。

陰性対照（トランスフェクションされていない細胞又は関係のない遺伝子でトランスフェクションされた細胞）とは対照的に、トランスフェクションされた細胞では平均蛍光強度の上昇が認められた。試験物質は平均蛍光強度に関して陰性対照より少なくとも2倍の平均蛍光強度の上昇があり、そして相対的な効力は参

照ロットの1/2から2倍（50%~200%）であった。

実施例13 無菌充填によってプラスミドDNA医薬品等級物質から医薬品プラスミドを製造する方法

上記実施例4a~e参照。この実施例では、プラスミドDNAの医薬品等級物質から次のように方法を継続する。

出発物質は、USP注射用乳酸リジンガー液又は他の無害の緩衝化した送達用媒体中1mg/ml又は他の適当に決定された濃度のプラスミドDNA医薬品等級溶液であった。このプラスミドDNA溶液は、クラス100の生物安全性領域で0.2ミクロンの無菌フィルター又はその等価物でろ過した。ろ液を無菌の発熱物質不含有容器に集めた。クラス100領域で、0.35mlの無菌プラスミドDNA溶液又は他の適切な量を発熱物質不含有の無菌のタイプ1ホウケイ酸塩ガラスバイアルに小分けした。この実施例では、各バイアルは0.35mgのDNAを含有していた。バイアルは、無菌テフロンで被覆した灰色のプチル栓及びフリップオフアルミニウムシールで包装した。シールは密閉を完全にするために翼をつけた。次に、これらのバイアルを品質管理に付しそして適切に表示した。

実施例14 医薬品等級DNAの品質仕様

プラスミドVCL-1005を標準的な大腸菌株DH10B（BRL、メリーランド州ガイザーバーク）中にトランスフォームした。細胞は標準的なTB培地を使用して10Lの発酵器（Braun）中で増殖させた。指数増殖期の終わりに、遠心によって細胞を採取しそしてアルカリ溶解（リゾチームを使用しないで）で溶解した。細胞破片はろ過して分離した。プラスミドDNAを沈殿させそして標準的な低圧クロマトグラフィーで分画した。適当なフラクションをプールしそしてDNAを製剤化した。濃度を調整しそしてDNAを無菌ろ過して無菌バイアル中に充填した。本発明の方法を使用すると、FDAによって規定されている大腸菌由来の医薬品の同一性、純度、効力及び安全性の規程を満たす十分な物質が前臨床及び臨床試験用に製造されそして精製された。

品質管理基準は次のとおりであり、この製品はこの規程を満たし医薬品等級DNAとなった。

VCL-1005の特徴  
品質管理規程

試験	仕様	方法	検出限界
外観	澄明、無色溶液	視覚観察	—
総サイズ	約4900塩基対	アガロースゲル 電気泳動	—
制限部位	概ね予測される塩基対: Bam HI 4900、Xho I/Xba I 1400、3500、Bgl II/Xho I 1000、1700、2100	アガロースゲル 電気泳動	—
環状プラスミド DNA	>95%、核酸酸に対して	アガロースゲル 電気泳動	0.01 $\mu$ g
A280/A260	1.75~2.00	UV吸光度	—
大腸菌 DNA	<0.01 $\mu$ g/プラスミド DNA $\mu$ g	サザンロット ブロット	100 pg
タンパク質 RNA	検出されない ゲル上で可視化されない	B CA比色計アッセイ アガロースゲル 電気泳動	1 $\mu$ g 0.03 $\mu$ g
エンドトキシン	<0.1 EU/プラスミド DNA $\mu$ g	リムラスアメボ サイト溶解物 (LAL) アッセイ	0.03 EU /ml
発熱性	5 $\mu$ g/ウサギ体重kg で発熱性なし	ウサギ 発熱物質	5 EU/kg
無菌性	14日間を通して増殖なし	旋体チオグリコレート	1 cfu
遺伝子発現	作用参照と同様に 50~200%の発現	インビトロトランス フェクション/蛍光	1 $\mu$ g
全体的な安全性	合格	21 CFR 610.11 による	—

これらのデータによって主要な宿主夾雑物の除去が確立されたと同時に、コンカテマープラスミドDNAや単量体プラスミドDNAを含む種々の形態のプラスミドDNAの分離も証明された。

加えて、マウスにおける急性及び反復投与毒性試験を実施した。シノモルグス

モンキーでの反復投与毒性試験も実施した。急性毒性の徴候もまた残留毒性の徴候も見られなかった。

実施例15 プラスミドDNAの単独又は陽イオン脂質混合物と組み合わせるの送達

本発明の医薬品製造方法によって精製されたプラスミドDNAは単独でか又は陽イオン脂質混合物と組み合わせる患者に送達することができる。例えば、医薬品はDMRIE/DOPE脂質混合物とコンプレックス化したVCL-1005プラスミドDNAである。プラスミドDNAとDMRIE/DOPEは別個の容器に個々に処方する。DMRIE/DOPE脂質バイアルは先ず乳酸リジンガー注射用媒体を用いて再構築しそしてその後、臨床使用前に臨床施設でVCL-1005プラスミドDNAバイアルと組み合わせる。組み合わせると同時に、このコンプレックスを医薬品適用のために患者に送達する。

本発明の特定の実施態様を詳細に記載したが、これらの実施態様は例示であって限定するものではなく、そして本発明の真の範囲は下記請求の範囲で特定されることは当該技術分野の熟練者に明白であろう。

[図1]

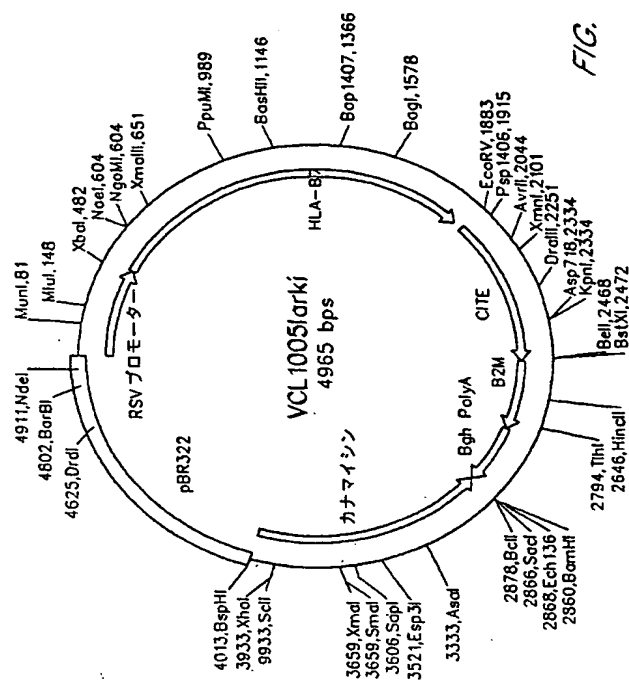


FIG. 1

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 95/00132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEMISTRY, vol. 20, no. 13, June 1981 pages 3748-3756, HILLEN W. ET AL. 'Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments'	1,5-7, 10,15, 19,22,24
Y	see the whole document ---	23
X	THE PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY, vol. 29, no. 4, 1985 pages 41-45, MORI A. AND OGITA Z.-I. 'Raid and economical method for purification of plasmid DNA'	1,6,7, 10,15, 19,22,24
Y	see the whole document ---	23

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 December 1995

Date of mailing of the international search report

16.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 581 & Patentamt 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 95/00132

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	HUAMN GENE THERAPY, vol. 6, May 1995 pages 565-573, HORN N.A. ET AL. 'Cancer gene therapy using plasmid DNA: Purification of DNA for human clinical trials' see the whole document ---	1-24
A	WO,A,92 13963 (HYMAN E.D.) 20 August 1992 -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 95/00132

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9213963	20-08-92	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>                      識別記号      庁内整理番号                      F I

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者      ミーク, ジェニファー

アメリカ合衆国, 92117 カリフォルニア,

サン ディエゴ, モウガタック アベニュー

2910番地

(72) 発明者      ブダハジ, グレッグ

アメリカ合衆国, 92109 カリフォルニア,

サン ディエゴ, ベイサイド レーン

3268 エイ 番地

**This Page Blank (uspto)**